

БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ НЕКОТОРЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАЦИЛЛ

К. В. ЧИТЧЯН, В. А. АБЕЛЯН

Институт микробиологии ИАН Армении, 378510, г. АБ

Изучена бета-галактозидазная активность у двух термофильных штаммов-активных продуцентов бета-галактозидазы. Определены некоторые биохимические и физико-химические характеристики ферментов. Благодаря своим уникальным свойствам они могут быть использованы для получения различных подсластителей на лактозной основе.

Ինստիտուտի մեջ 1 երկու տերմոֆիլ բակտերիաների բետա-գալակտոզիդազային ակտիվությունը: Բացահայտվել են ֆերմենտի որոշ բնութագրական և ֆիզիկոքիմիական հատկություններ: Ենթադրվում է, որ շնորհիվ իրենց յուրահատկության նրանք կարող են կիրառվել բնականորեն կենդանի մարմին բնագործողների ստացման համար:

Two thermophilic strains-active producers of beta galactosidase have been found. Some physicochemical and biochemical properties of enzymes obtained have been studied. Due to the unique characteristics of the enzymes they may be used for the production of various sweeteners from lactose.

Фермент - бета-галактозидаза - термофилы

В настоящее время получение различных подсластителей-заместителей обычного сахара с низкой калорийностью и оздоровительным эффектом является достаточно важной задачей. В этой связи определение интерес представляет бета-галактозидаза (КФ 3.2.1.23), которая широко применяется в процессах получения безлактозного молока и переработки молочной сыворотки [1,7,9,12,15], с целью получения различных глюкозно-галактозных сиропов. Эффективность существенно может возрасть при применении ее термофильных форм, поскольку процессы могут быть осуществлены при температурах пастеризации молока, что исключает прорастание посторонней микрофлоры.

Материал и методика. В качестве культур-продуцентов бета-галактозидазы использовали термофильные *Bacillus* sp. K₁ и K₂ из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии ИАН Армении (ИНМИА), которые выращивали в течение 18 ч при 56° на жидкой питательной среде, содержащей (г/л): пептон -10,0; дрожжевой экстракт-5,0; лактозу-5,0; $MnCl_2$ - 0,001; pH 7,0-7,2. Биомассу отделяли центрифугированием при 5 000 г в течение 15-20 мин. Бета-галактозидазную активность определяли согласно известному методу [2]. Количество общих сахаров фенол-серной кислотой [5], а редуцирующих сахаров - по [11,14]. Лактозу, глюкозу и галактозу идентифицировали спектрофотометрически с применением ферментативных китов [3].

В работе использовали лактозу отечественного производства и О-нитрофенил-бета-Д-галактопиранозид (ONPG) фирмы "SERVA".

Результаты и обсуждение. С целью выявления наиболее перспективных термофильных продуцентов бета-галактозидазы были исследованы экстремофильные формы бацилл.

Для ферментов отобранных культур были определены некоторые физико-химические и биологические параметры.

Клетки обеих культур свою максимальную активность проявляли при pH 7,0, отклонение от которого приводит к значительному падению их эффективности. Так, уже при pH 6,5 они имеют всего 77-80 %, а pH 7,5 - 65-70% максимальной активности (табл.1).

Таблица 1. Влияние pH на бета-галактозидазную активность клеток бацилл (смесь 20 мг биомассы и 10 мг лактозы в 1 мл 0,01 М соответствующего буфера, инкубировали при 50° в течение 60 мин)

pH	Активность, ед/мин		Активность, % от максимальной	
	шт. K ₁	шт. K ₂	шт. K ₁	шт. K ₂
5,0	59,0	153,0	16,0	45,0
6,0	117,0	197,0	29,0	58,0
6,5	300,0	272,0	77,0	80,0
7,0	390,0	340,0	100,0	100,0
7,5	273,0	221,0	70,0	65,0
8,0	97,5	153,0	25,0	45,0

Аналогичные результаты были получены также при исследовании pH стабильности клеток. Достаточную стабильность они проявляют в интервале pH от 5,0 до 8,0 (табл.2).

Таблица 2. pH стабильность интактных клеток Bacillus sp. K₁ и K₂ (обработку клеток проводили при 70° в течение 30 мин)

Время экспози- ции, мин	Остаточная бета- галактозидазная активность, %									
	pH 5,0		6,0		6,5		7,0		8,0	
	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂
0	16	45	29	58	77	80	100	100	25	45
20	10	21	16	17	51	28	70	40	19	33
40	9 ^c	16	13	15	46	24	64	35	14	24
60	0	3	10	12	36	20	54	30	6	16

Изучаемые культуры наиболее эффективно способны работать при 70° (табл.3), однако высокая стабильность наблюдается лишь при температурах до 60° (табл.4).

Таблица 3. Влияние температуры на бета-галактозидазную активность термофильных культур (смесь 20 мг биомассы и 10 мг лактазы в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера. рН 7,0, инкубировали в течение 60 мин)

Температура °C	Активность, % от максимальной	
	K ₁	K ₂
45	20	
50	39	55
55	55	70
60	66	80
65	85	92
70	100	100
75	80	95
80	60	90

Таблица 4. Термостабильность интактных клеток с бета-галактозидазной активностью (клетки в 0,01 М фосфатном буфере. рН 7,0, выдержка в течение 180 мин)

Время экспози- ции, мин	Остаточная бета-галактозидазная активность, %									
	40°		50°		60°		70°		80°	
	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
60	64	66	58	56	54	50	50	35	42	20
120	55	48	48	40	41	34	32	23	22	14
180	44	39	36	33	32	28	23	19	14	10

Для изучения влияния различных двухвалентных ионов металлов на бета-галактозидазную активность клетки в количестве 20 мг суспендировали в 2 мл дистиллированной воды, содержащей 0,5-1,0 мМ иона металла, и суспензию выдерживали при 50° в течение 30 мин. Затем клетки отделяли центрифугированием и их бета-галактозидазную активность определяли в оптимальных условиях. Среди исследованных ионов только Mn^{+2} оказывал слабое защитное влияние на специфическую активность, в то время как остальные

проявляли ингибирующий эффект в различной степени. Особенно нежелательно присутствие в реакционной смеси ионов Zn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} и Co^{+2} (табл. 5).

Значение K_m , определенное в координатах Лайнуивера-Берка составляло 82,6 и 118,2 мМ/мл (по лактозе), а V_{max} 0,04 и 0,05 мМ/мин соответственно для штаммов K1 и K2.

Таблица 5. Влияние ионов двухвалентных металлов на бета-галактозидазную активность клеток

Добавки	Концентрация, мМ	Активность, % от максимальной	
		K1	K2
Fe^{+2}	1,0	100	100
Mn^{+2}	1,0	110	116
Ca^{+2}	1,0	90	104
Mg^{+2}	1,0	82	92
Zn^{+2}	1,0	55	60
Fe^{+3}	0,5	60	52
Cu^{+2}	0,5	48	44
Co^{+2}	0,5	63	68
Ba^{+2}	0,5	72	76

Выявленные параметры в сравнении с известными термостабильными бета-галактозидазами суммированы в табл. 6.

Таблица 6. Сравнительная характеристика термостабильных бета-галактозидаз

Источник фермента	Оптимум		Термостабильность, °C	K_m , мМ	Ссылка
	pH	t, °C			
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	6,0	65-70	50	100-120	[9]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,0	60	60	110	[6]
<i>Cardanella acidophila</i>	5,0	80	70	61,5	[4]
<i>Altermana alternata</i>	4,5-5,5	60-70	65		[10]
<i>Altermana palni</i>	5,5-6,0	70	65		[13]
<i>Thermus aquaticus</i>	5,0	80	90	7,5	[16]
<i>Bacillus</i> sp. K1 (клетки)	7,0	70	60	82,6	
<i>Bacillus</i> sp. K2 (клетки)	7,0	70	60	118,2	

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нахапетян П.А., Мотина Л.И. Биотехнология, 4, 1, 4-21, 1988
2. Энтеробактерии. Под ред. В.И. Похровского. М. 1985.
3. Bergmeyer H.U., Ber. I.E., Schmidt F., Stenil H. Methods of enzymatic analysis. NY AP 3 1195-1201, 1974
4. Buonocore V., Sgambati O., Rosa M., Esposito E., Cambacorta A. J. Appl. Biochem., 2, №0-394, 1980
5. Dubois M., Gills R., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Anal. Chem., 28, 350-354, 1959
6. Griffiths M.W., Muir D.D. J. Sci. Food Agric., 29, 753-757, 1978
7. Honda Y., Haseba H., Aihiko K., Takahashi H. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 38, 324-330, 1991
8. Kobayashi T., Hirose Y., Ohnura K., Saito S., Uchino F. J. Ferment. Technol., 55, 309-312, 1976
9. Kohkay D.E., Gheryan M. Enzyme Microb. Technol., 2, 64-68, 1981.
10. Macris E.J. Ann. Environ. Microbiol., 44, 1035-1040, 1982
11. Melton N.J. Biol. Chem., 153, 376-380, 1944
12. Oksa E.S., Harper W.J. J. Food Sci., 49, 28-102, 1974
13. Sanjay A., Sonawar H.M., Datta S.M. J. Dairy Sci., 65, 866-870, 1982
14. Somogyi M.J. Biol. Chem., 170, 19-21, 1952
15. Toba T. J. of Dairy and Food Sci., 24, 165-187, 1985.
16. Ulrich J.T., McFeters G.A., Temple K.L. J. Bacteriol., 170, 691-694, 1972

Поступила 22.IX.1994

Биолог. журн. Армения, 1, (48), 1995

УДК 576.251.5:577.15.01

АСПАРТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАЦИЛЛ И АКТИНОМИЦЕТОВ

С.Н. БАГДАСАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Приведены данные о распространении аспартазы среды 10 видов термофильных бацилл и 5 видов термоактиномицетов. Выявлены новые активные продуценты аспартазы, которые могут быть использованы при ферментативно-микробиологическом получении L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония.

Ներկայում են ապարտազային ակտիվությունը բացահայտված 10 տեսակի տերմոֆիլիկ բացիլների և 5 տեսակի տերմոակտինոմիցետների մասին: Հայտնաբերվել են ակտիվ ապարտազային հոր արտադրիչներ, որոնք կարող են օգտագործվել ամոնիումի ֆումարատից L-ապարտինաթթվի ֆերմենտատիվ-մանրէաբանական ստացման նպատակով:

The data on distribution of aspartase in 10 species thermophilic bacilli and 5 species thermoactinomyces are given.

The new active producers of aspartase which may be used for enzymatic microbiological production of L-aspartic acid from ammonium fumarate have been revealed.